

PCTORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE
Bureau international

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁷ :

C12N 15/82, A01H 5/00

A1

(11) Numéro de publication internationale:

WO 00/70065

(43) Date de publication internationale: 23 novembre 2000 (23.11.00)

(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR00/01318

(22) Date de dépôt international: 17 mai 2000 (17.05.00)

(30) Données relatives à la priorité:

99/06231

17 mai 1999 (17.05.99)

FR

(81) Etats désignés: CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

Publiée

Avec rapport de recherche internationale.

(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE (INRA) [FR/FR]; 147, rue de l'Université, F-75338 Paris Cedex 07 (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (US seulement): GAUTIER, Marie-Françoise [FR/FR]; 16, rue Cyrano de Bergerac, F-34090 Montpellier (FR). IHORAI, Tania [FR/FR]; 101, rue Chateaubriand, F-63100 Clermont-Ferrand (FR). JOUDRIER, Philippe [FR/FR]; 60, rue Jeanne Garnerin, F-34070 Montpellier (FR).

(74) Mandataires: VIALLE-PRESLES, Marie-José etc.; Cabinet Orès, 6, avenue de Messine, F-75008 Paris (FR).

(54) Title: PROMOTER OF THIOREDOXINE TaTrxh2 IN WHEAT

(54) Titre: PROMOTEUR DE LA THIOREDOXINE TaTrxh2 DE BLE

(57) Abstract

The invention relates to the cloning of the promoter of thioredoxine TaTrxh2 in wheat and the use thereof in controlling the expression of the gene of interest in transgenic plants or plant cells.

(57) Abrégé

L'invention est relative au clonage du promoteur de la thiorédoxine TaTrxh2 de blé, et à son utilisation pour contrôler l'expression de gène d'intérêt dans des plantes transgéniques ou des cellules végétales.

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce			TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	ML	Mali	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MN	Mongolie	UA	Ukraine
BR	Brsil	IL	Israël	MR	Mauritanie	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MW	Malawi	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	MX	Mexique	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NE	Niger	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NL	Pays-Bas	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NO	Norvège	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	NZ	Nouvelle-Zélande		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PL	Pologne		
CN	Chine	KZ	Kazakhstan	PT	Portugal		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RO	Roumanie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	RU	Fédération de Russie		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SD	Soudan		
DK	Danemark	LR	Libéria	SE	Suède		
EE	Estonie			SG	Singapour		

PROMOTEUR DE LA THIORÉDOXINE TaTrxh2 DE BLE

L'invention est relative au clonage et à la caractérisation d'un promoteur de thiorédoxine de blé.

Les thiorédoxines sont des protéines de faible poids moléculaire, qui ont été mises en évidence chez un grand nombre d'organismes, où elles catalysent différentes réactions d'oxydoréduction impliquant des échanges dithiolsulfhydryles. Leur site catalytique comprend la séquence conservée : -Trp-Cys-Gly/Pro/Ala-Pro-Cys-. Les thiorédoxines sous forme oxydée comprennent un pont disulfure, dont la réduction en groupes -SH, par la ferrédoxine réduite ou par le NADPH, est catalysée par l'intermédiaire d'un système spécifique.

Chez les plantes, on a mis en évidence 3 types de thiorédoxine : les 2 premières (thiorédoxines m et f), sont des thiorédoxines ferrédoxine-dépendantes, localisées dans les chloroplastes, où elles interviennent dans la régulation de la photosynthèse. Un troisième type, dénommé thiorédoxine h, a été mis en évidence dans le cytosol. La thiorédoxine h fait partie d'un système thiorédoxine NADP-dépendant (NTS), où elle est associée au NADPH et à une enzyme dénommée NADP-thiorédoxine réductase (NTR).

Initialement, 2 thiorédoxines h ont été extraites et partiellement purifiées à partir du grain de blé (VOGT et FOLLMANN, Biochem. Biophys. Acta 873, 415-418, 1986). Récemment, l'équipe des Inventeurs a isolé et caractérisé 2 clones d'ADNc codant une thiorédoxine h de blé tendre (TaTrxh1), et une thiorédoxine h de blé dur (TdTrxh1) (GAUTIER et al., Eur. J. Biochem. 252, 314-324, 1998). Les structures primaires déduites des clones d'ADNc des thiorédoxines h TaTrxh1 et TdTrxh1 sont très conservées (96% d'identité entre elles). Elles possèdent une extension N-terminale très riche en résidus Ala, dont l'analyse révèle un domaine transmembranaire putatif de 20 résidus. Elles présentent de fortes homologies avec

les thiorédoxines h de céréales (70 à 80%) et les thiorédoxines h de dicotylédones (60%).

Les thiorédoxines h interviennent au cours de la germination du grain de blé, où elles participent, au
5 niveau de l'albumen, à la mobilisation des réserves nécessaires à la croissance de l'embryon. Elles agissent notamment :

- en réduisant les ponts disulfure de certaines protéines de réserve, telles que les gliadines
10 et les gluténines (KOBREHEL et al., Plant Physiol. 99, 919-924, 1992), ce qui augmente leur sensibilité à la protéolyse ;

- en réduisant des enzymes impliquées dans la mobilisation des réserves, ou des inhibiteurs de ces
15 enzymes, ce qui entraîne l'activation des premières, et la désactivation des seconds.

Il a également été proposé d'utiliser les thiorédoxines h pour améliorer la qualité d'aliments, notamment à base de céréales ; il a en effet été constaté
20 qu'elles favorisaient la formation de la pâte lors de la fabrication du pain (WONG et al., Cereal Chem. 70, 113-114, 1993), et qu'en outre elles diminuaient l'allergénicité de certains aliments.

Les Inventeurs ont entrepris l'étude de
25 l'expression des thiorédoxines h dans les graines de céréales, notamment dans le blé, afin de fournir des moyens de contrôle de cette expression.

Dans le cadre de ces travaux, ils ont isolé un gène dénommé ci-après *TaTrxh2*, codant une thiorédoxine h
30 de blé tendre (*Triticum aestivum*), dénommée ci-après *TaTrxh2*, dont la structure primaire présente 97% de similarité avec celle de la thiorédoxine h *TaTrxh1* de blé tendre (GAUTIER et al., 1998, publication précitée).

Les Inventeurs ont également isolé le
35 promoteur du gène *TaTrxh2*, et ont exprimé, chez le riz, le gène rapporteur *gus* sous contrôle de ce promoteur. Ils

ont ainsi observé que l'expression du gène rapporteur était localisée exclusivement dans le grain de riz et plus particulièrement dans l'albumen amyloacé. Ils ont en outre mis en évidence des régions impliquées dans la
5 régulation spatiale et temporelle de ce promoteur.

La séquence du gène *TaTrxh2* et de la région en 5' comprenant le promoteur sont représentées dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID NO: 1.

La présente invention a pour objet un
10 promoteur constitué par un fragment d'acide nucléique comprenant au moins un domaine fonctionnel spécifique du promoteur du gène *TaTrxh2*.

On entend par « promoteur » une séquence d'ADN double-brin comprenant au moins les séquences nécessaires
15 à l'initiation de la transcription d'un gène, éventuellement associées à des séquences de contrôle en cis de ladite transcription ; on entend par : « domaine fonctionnel spécifique d'un promoteur », une séquence dudit promoteur comprenant un ou plusieurs motifs d'ADN
20 intervenant dans l'initiation de la transcription, ou bien une séquence d'ADN double-brin constituant un domaine de régulation comprenant un ou plusieurs des motifs d'ADN intervenant dans le contrôle en cis de la transcription par ledit promoteur.

25 Des promoteurs conformes à l'invention peuvent comprendre en particulier :

a) le fragment d'acide nucléique représenté dans la liste de séquences en annexe par la séquence
30 SEQ ID NO : 2, ainsi que sur la figure 1, et qui correspond à la région 5' non codante du gène *TaTrxh2* s'étendant de la position -1 à la position -1111 par rapport au codon d'initiation ATG, ou des portions dudit fragment, notamment :

* le fragment d'acide nucléique dont la
35 séquence s'étend de la position -1 à la position -83 par rapport au codon ATG du gène *TaTrxh2* ; ce fragment

comprend les séquences intervenant dans l'initiation de la transcription, et nécessaires à l'activité de base du promoteur ;

- * des fragments d'acide nucléique comprenant
- 5 des domaines fonctionnels intervenant dans la régulation de la transcription du gène *TaTrxh2*, et en particulier dans sa spécificité tissulaire et/ou dans son expression à différents stades du développement de la plante ; il s'agit en particulier :
- 10 - du fragment d'acide nucléique dont la séquence s'étend de la position -591 à la position -1111 par rapport au codon ATG du gène *TaTrxh2* ; ce fragment comprend un domaine de régulation intervenant dans l'inhibition de l'expression du gène *TaTrxh2* dans
- 15 l'épithélium du scutellum ;
- du fragment d'acide nucléique dont la séquence s'étend de la position -228 à la position -451 par rapport au codon ATG du gène *TaTrxh2* ; ce fragment comprend un domaine de régulation intervenant dans
- 20 l'induction de l'expression du gène *TaTrxh2* en début de maturation du grain ;
- du fragment d'acide nucléique dont la séquence s'étend de la position -451 à -591 par rapport au codon ATG du gène *TaTrxh2* ; ce fragment comprend un
- 25 domaine de régulation intervenant dans l'induction de l'expression du gène *TaTrxh2* dans l'épithélium du scutellum ;
- du fragment d'acide nucléique dont la séquence s'étend de la position -83 à la position -228 par rapport au codon ATG du gène *TaTrxh2* ; ce fragment
- 30 comprend des séquences intervenant dans l'induction de l'expression au niveau de l'albumen amyloacé.
- b) du fragment d'acide nucléique constituant le premier intron (positions 1232-2203 sur la séquence
- 35 SEQ ID NO: 1) du gène *TaTrxh2* ; ce fragment pourrait comprendre un domaine de régulation de type

amplificateur, augmentant le niveau d'expression du gène *TaTrxh2*.

L'homme du métier peut, à partir des fragments comprenant au moins un domaine fonctionnel du promoteur du gène *TaTrxh2* spécifiés ci-dessus, identifier plus précisément les limites de ces domaines fonctionnels, ainsi que les motifs d'ADN impliqués dans la fonction de chacun d'entre eux, par des techniques connues en elles-mêmes, par exemple par la technique des empreintes sur l'ADN (footprints), en incubant ces fragments avec des extraits nucléaires de cellules de l'albumen du grain, ainsi qu'avec des extraits nucléaires de cellules dans lesquels le promoteur du gène *TaTrxh2* est inactif.

L'invention englobe en particulier tout promoteur pouvant être obtenu à partir d'un fragment d'acide nucléique comprenant au moins un domaine fonctionnel du promoteur du gène *TaTrxh2*, par les techniques classiques du génie génétique, notamment par mutagénèse et/ou recombinaison génétique. Il est ainsi possible de produire des promoteurs artificiels possédant le niveau d'activité, et le degré de spécificité souhaité.

On peut ainsi par exemple inactiver un ou plusieurs des domaines fonctionnels de régulation localisés dans la région 5' non codante du gène *TaTrxh2*, par exemple en procédant à la délétion d'au moins un nucléotide ou d'une séquence de nucléotides des motifs d'ADN impliqués dans la fonction du ou des domaines concernés. On peut également associer les molécules d'acide nucléique comprenant des domaines fonctionnels du promoteur du gène *TaTrxh2* entre elles, et/ou avec des domaines fonctionnels provenant de promoteurs autres que celui du gène *TaTrxh2*.

Selon un mode de réalisation préféré d'un promoteur conforme à l'invention, il comprend au moins les séquences du promoteur de *TaTrxh2* qui permettent une

expression spécifique dans le grain, notamment dans l'albumen amylacé.

L'invention englobe également :

- les cassettes d'expression, comprenant, outre un promoteur conforme à l'invention, un gène d'intérêt placé sous contrôle transcriptionnel dudit promoteur, ou un site permettant l'insertion dudit gène d'intérêt ;
- les vecteurs recombinants, résultant de l'insertion d'un promoteur ou d'une cassette d'expression conformes à l'invention dans un vecteur hôte.

Les promoteurs conformes à la présente invention peuvent être utilisés pour contrôler l'expression d'un gène d'intérêt dans des cellules de plantes, notamment de monocotylédones.

Ledit gène d'intérêt peut par exemple être soit le gène *TaTrxh2*, placé sous contrôle d'un promoteur artificiel, tel que défini ci-dessus, dérivé du promoteur *TaTrxh2*, soit un gène hétérologue codant une thiorédoxine autre que *TaTrxh2*, ou toute autre protéine d'intérêt.

On peut par exemple introduire un gène d'intérêt sous contrôle du promoteur du gène *TaTrxh2*, ou d'un promoteur artificiel construit à partir des éléments de régulation de celui-ci qui confèrent la spécificité d'expression dans les cellules de l'albumen, afin d'exprimer ledit gène d'intérêt uniquement dans les cellules de l'albumen du grain. On peut également procéder à la délétion sélective des séquences du promoteur du gène *TaTrxh2* responsables de la spécificité d'expression, afin de construire un promoteur artificiel permettant d'assurer une expression ubiquitaire d'une thiorédoxine h, ou d'une autre protéine d'intérêt.

L'invention a en outre pour objet des cellules végétales et des plantes transgéniques, en particulier des monocotylédones, et notamment des céréales,

transformées par au moins une molécule d'acide nucléique comprenant un promoteur conforme à l'invention.

Les Inventeurs ont ainsi obtenu des riz transgéniques, dans lesquelles un gène hétérologue a été placé sous contrôle transcriptionnel du promoteur du gène *TaTrxh2* et ont observé chez ces plantes une expression spécifique dans les cellules de l'albumen du grain.

Les cellules transformées et les plantes transgéniques conformes à l'invention sont également utilisables comme modèles pour étudier et/ou modifier l'expression de différents gènes dans les cellules de l'albumen du grain.

La présente invention sera mieux comprise à l'aide du complément de description qui va suivre, qui se réfère à des exemples non-limitatifs illustrant le clonage et la caractérisation du gène *TaTrxh2* et de son promoteur.

EXEMPLE 1 : ISOLEMENT ET CARACTERISATION DU GENE *TaTrxh2*

1.- Criblage d'une banque d'ADN génomique de blé

Une banque d'ADN génomique a été réalisée à partir de l'ADN extrait de feuilles de blé tendre (*Triticum aestivum*) de la variété Andain. Après digestion partielle de l'ADN génomique par *MboI*, les fragments de taille moyenne 15 kb ont été clonés au site *BamHI* du phage EMBL3 SP6/T7, qui a été propagé dans la bactérie hôte K802 -K 802 (*galK2*, *galT22*, *HsdR2*, (*r_k*⁻, *m_k*⁺), *mcrA*⁻, *mcrB*⁻, *metB1*, *mrr*⁺, *supE44*).

6.10⁶ clones de la banque d'ADN génomique ont été étalés et criblés avec une sonde de 669 pb (TRX) contenant la totalité de la séquence codant la thiorédoxine h de blé tendre *TaTrxh1* (GAUTIER et al., 1998, publication précitée), et les clones positifs ont ensuite été criblés par ACP (amplification en chaîne par polymérase) à l'aide d'un couple d'amorces (THP2 et THM2) dérivées de la même séquence.

L'un des clones sélectionnés (λ 4), qui contient un fragment d'ADN génomique de blé de 10 kb environ, a été digéré par *Pst*I, libérant deux fragments, l'un de 1,5 kb et l'autre de 3,8 kb, tous les deux reconnus par la sonde TRX. Ces deux fragments ont été clonés dans le vecteur pLITMUS 29 (BIOLAB) au site de restriction *Pst*I. Les deux clones obtenus sont dénommés CTRX3 et CTRX4. Le clone CTRX3 correspond au fragment de 1,5 kb et le clone CTRX4 au fragment de 3,8 kb.

L'analyse des séquences nucléotidiques des clones CTRX4 et CTRX3 montre qu'ils contiennent chacun une partie d'un même gène codant une thiorédoxine h de blé, tronqué lors de la digestion par *Pst*I.

A partir des séquences nucléotidiques de ces 2 clones, les Inventeurs ont choisi deux amorces (THP8 et THM8) permettant d'amplifier un gène de thiorédoxine h sur une longueur d'environ 2,6 kb. L'ACP a été réalisée sur l'ADN non digéré du clone λ 4, et un fragment de la taille attendue a été cloné dans le vecteur pGEM-T (PROMEGA). Le clone obtenu contient le gène *TaTrxh2* codant une thiorédoxine h de blé tendre.

Il comprend une région promotrice de 1111 pb, une région codante de 1447 pb, et une région 3' non codante de 131 pb.

La région codante du gène *TaTrxh2* comprend trois exons de 120, 123 et 135 pb séparés par deux introns, de 972 pb et de 93 pb. Le premier exon code un polypeptide de 40 acides aminés, le deuxième exon code un polypeptide de 41 acides aminés contenant le site actif, et le troisième exon code un polypeptide de 45 acides aminés.

La séquence nucléotidique du gène *TaTrxh2* code une thiorédoxine h de blé tendre, nommée *TaTrxh2*, de 126 acides aminés, de masse moléculaire calculée 13435 Da et de pI calculé 5,0.

La comparaison des séquences des produits de traduction du gène *TaTrxh2* et des gènes *TaTrxh1* précédemment décrite par GAUTIER et al. (1998, publication précitée) et *TdTrxh1* (thiorédoxine h de blé dur) montre qu'elles sont très conservées. En effet, la
5 séquence peptidique de *TaTrxh2* présente 97% de similarité et 94% d'identité avec celle de *TaTrxh1* et 95% de similarité et 90% d'identité avec celle de *TdTrxh1*.

Le domaine N-terminal de *TaTrxh2* est plus
10 court que celui de *TaTrxh1* et *TdTrxh1*. La structure primaire de *TaTrxh2* ne contient pas de peptide signal, suggérant que la protéine est localisée dans le cytoplasme. Cependant, elle présente une extension N-terminale déjà mise en évidence dans la structure
15 primaire de *TaTrxh1* et *TdTrxh1*, pouvant correspondre à un domaine transmembranaire. L'analyse de l'extension N-terminale de *TaTrxh2* avec le programme RAO ARGOS (PC/gene, RAO et al., Biochem. Biophys. Acta 869, 197-214, 1986) révèle un domaine transmembranaire putatif
20 entre les résidus 2 et 19. Le site actif, formé des 5 acides aminés suivants : WCGPC, est conservé entre les 3 thiorédoxines h de blé *TaTrxh2*, *TaTrxh1* et *TdTrxh1*.

Les introns ont des tailles différentes de celles des introns des gènes de thiorédoxines h de blé
25 précédemment mis en évidence par ROBERT (1994) indiquant que le gène *TaTrxh2* est différent de ceux-ci. Les introns du gène *TaTrxh2* sont du type 0 et sont limités en 5' par la séquence GTA et en 3' par la séquence CAG, qui correspondent à des séquences consensus des limites
30 intron-exon.

La région 3' non codante du gène *TaTrxh2* présente le signal de polyadénylation AATAAA commun aux gènes transcrits par l'ARN polymérase II.

EXEMPLE 2 : ANALYSE STRUCTURELLE DU PROMOTEUR DU GENE *TaTrxh2*

Le promoteur du gène *TaTrxh2* a été analysé pour rechercher des motifs de régulation putatifs susceptibles d'intervenir dans le contrôle de l'expression, et a notamment été comparé à celui des gènes de thiorédoxines h de *C. reinhardtii* (STEIN et al., Plant Mol. Biol. 28, 487-503, 1995), de tabac (BRUGIDOU et al., Mol. Gen. Genet 238, 285-293, 1993) et de riz (ISHIWATARI et al., 1995), de la thiorédoxine m de *C. reinhardtii* (STEIN et al., 1995), et des thiorédoxines murine (MATSUI et al., Gene 152, 165-171, 1995) et humaine (TONISSEN et al., Gene 102, 221-228, 1992 ; KAGHAD et al., Gene 140, 6643-6653, 1994).

La séquence du promoteur du gène *TaTrxh2* est représentée sur la figure 1.

Le site d'initiation de la transcription (représenté sur la figure 1 en gras et souligné d'un double trait) est une adénine située à -65 pb de l'ATG.

Le promoteur du gène *TaTrxh2* ne contient aucune séquence consensus correspondant à une boîte TATA ou à une boîte CAAT aux positions attendues pour les gènes transcrits par l'ARN polymérase II.

En revanche, il contient une boîte TATA-like (AATTTAT, soulignée d'un double trait sur la figure 1) à -105 pb de l'ATG.

Il contient également une boîte GC (GGGCCGGG, soulignée en pointillés sur la figure 1) située à -84 pb de l'ATG du gène *TaTrxh2*. Les boîtes GC sont reconnues par des facteurs de transcription de type Sp1 (DYNAN et al. Nature 316, 774-778, 1985), et interviennent dans l'expression constitutive des gènes. Des boîtes GC sont présentes dans tous les promoteurs connus de gènes de thiorédoxines.

Une séquence riche en adénine, interrompue par un résidu G (AAAAAAAGAAAAAAA, en caractères gras

soulignés d'un trait simple sur la figure 1), est située à -227 pb de l'ATG du gène *TaTrxh2* ; des séquences de ce type ont également été identifiées précédemment dans les promoteurs des gènes de thiorédoxine h de tabac et de riz.

Des séquences *bHLH* (CANNTG), reconnues par des facteurs de transcription de la famille hélice/boucle/hélice, sont localisées à -206 pb et -411 pb de l'ATG du gène *TaTrxh2* ; elles sont représentées sur la figure 1 en lettres minuscules.

Des séquences *bzip* (ACGT, soulignées d'un trait simple sur la figure 1) reconnues par des facteurs de transcription de la famille des fermetures éclair à leucine (bZIP), sont localisées à -251 pb et -184 pb de l'ATG du gène *TaTrxh2*. Les protéines bZIP ont été décrites dans l'activation de l'expression de gènes codant des protéines de réserve du grain. Des motifs ACGT, ont également été décrits dans des séquences consensus ABRE (ABA-responsive element) des promoteurs de gènes dont l'expression est régulée par l'acide abscissique (ABA) (MUNDY et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 1406-1410, 1990).

Deux boîtes pyrimidine (CCTTTCTCT et TCTTTCTTC, encadrées sur la figure 1) sont respectivement localisées à -553 pb et -541 pb de l'ATG du gène *TaTrxh2*. Les boîtes pyrimidine (CCTTTT) interviennent dans la régulation de l'expression par l'acide gibérellique, généralement en association avec des séquences GARE (GA-responsive element) (TAACAAA) (HUANG et al., Plant Mol. Biol. 14, 115-121, 1990), et des séquences O2S (opaque-2-binding sequence) ou boîte I (TATCCAT) (GUBLER et al., Plant Cell 4, 1435-1441, 1992 ; LANAHAN et al., Plant Cell, 4, 203-211, 1992), avec lesquelles elles s'organisent en un complexe appelé GARC (GA-responsive complex) (BETHKE et al., Bot. 48, 1337-1356, 1997).

Aucune séquence GARE ou O2S n'a été mise en évidence dans les 1111 pb en amont de l'ATG du gène *TaTrxh2*.

Un motif TGTGTGAGCA (en caractères gras, et souligné d'un trait en pointillés sur la figure 1) est
5 situé à -403 pb de l'ATG du gène *TaTrxh2*. Ce motif ne diffère que par la présence d'un résidu G supplémentaire, de la séquence consensus « GCN4-like » (TGTGTGACA) de la « boîte albumen » impliquée dans l'expression albumen-spécifique de gènes de gluténines de blé (HAMMOND-KOSACK
10 et al., EMBO J. 12, 545-554, 1993). Cependant, l'autre motif de la boîte albumen, dénommé EM (TGTAAGAGT), et dont la présence est également nécessaire pour l'expression albumen-spécifique (ALBANI et al., Plant
Cell 9, 171-184, 1997), n'a pas été mis en évidence dans
15 les 1111 pb en amont de l'ATG du gène *TaTrxh2*.

Des diades trimériques CAA et TTG (en italique sur la figure 1) séparées par 10 bases, sont présentes respectivement à -107 pb et -97 pb de l'ATG du gène
20 *TaTrxh2*. Ces motifs sont associés à une expression spécifique dans la couche à aleurone (THOMAS et al., Plant Cell 2, 1171-1180, 1990).

EXEMPLE 3 : ANALYSE FONCTIONNELLE DU PROMOTEUR DU GENE *TaTrxh2*.

La séquence de 1111 pb en 5' de l'ATG du gène
25 *TaTrxh2*, ou différents fragments de cette séquence ont été clonés en amont de la séquence codante du gène rapporteur *gus* dans le vecteur pSPORT1-GUS. Le vecteur pSPORT1-GUS (DIGEON, 1997) contient la séquence codante du gène *gus* (β -glucuronidase d'*E. coli*) et le terminateur
30 nos-ter du gène de la nopaline synthase, insérés au site EcoRI-HindIII du vecteur pSPORT1 (GIBCO BRL).

Les constructions réalisées sont les suivantes :

- P1 : cette construction comprend la totalité
35 de la séquence de 1111 pb en amont de l'ATG du gène *TaTrxh2* ;

- P2 : cette construction comprend la séquence de 589 pb en amont de l'ATG du gène *TaTrxh2* ;

- P3 : cette construction comprend la séquence de 481 pb en amont de l'ATG du gène *TaTrxh2* ;

5 - P4 : cette construction comprend la séquence de 228 pb en amont de l'ATG du gène *TaTrxh2* ;

- P5 : cette construction comprend la séquence de 83 pb en amont de l'ATG du gène *TaTrxh2*.

10 Les limites des régions du promoteur du gène *TaTrxh2* utilisées dans les constructions sont indiquées sur la figure 1.

A titre de témoin positif, on a utilisé le vecteur pUGC1 (CHAÏR et al., 1996), qui permet l'expression constitutive et ubiquitaire du gène *gus* sous
15 le contrôle du promoteur, du premier exon et du premier intron du gène codant l'ubiquitine du maïs.

Le vecteur pSPORT1-GUS a été utilisé comme contrôle négatif.

Ces différentes constructions ont été
20 transférées par bombardement selon le protocole décrit par FAUQUET et al. (Proc. Third. Int. Rice Genet. Symp., Ed. G.S. Khush, 153-165, 1996), dans de jeunes cals embryogènes de riz (var. japonica IRAT 349) dérivant de la prolifération du scutellum de l'embryon mature. Toutes
25 les constructions testées ont été co-transférées avec le vecteur pILTAB227 (FAUQUET et al., 1997), qui confère la résistance à l'hygromycine et qui permet la sélection des cellules transformées.

Un mélange du vecteur portant la construction
30 à tester, et du vecteur pILTAB227 (rapport molaire : vecteur à tester/pILTAB227 = 4/1) est utilisé pour enrober des microparticules d'or, à raison de 5 µg d'ADN total (3 µg d'ADN à tester + 2 µg de pILTAB227) à une concentration de 1 µg/µl, pour 3 mg d'un mélange en
35 quantité égale de microparticules d'or de diamètres

1,0 μm et 1,6 μm , en suspension dans 50 μl d'eau distillée.

Le bombardement est effectué à l'aide d'un canon à particules PDS-1000/He (PARTICULE DELIVERY SYSTEM, BIORAD).

Les cals embryogènes bombardés sont ensuite criblés sur un milieu de sélection contenant de l'hygromycine. Les cals résistants à l'hygromycine sont sélectionnés et placés sur milieu de régénération dépourvu d'hygromycine. Les plants régénérés (génération F0) ont ensuite été transférés dans des pots, et, après acclimatation en phytotron, sont cultivés en serre.

L'expression du gène *gus* a été recherchée dans les organes végétatifs et dans les graines des riz des générations T0 et T1. Seules les plantes fertiles et présentant un phénotype normal, ont été retenues pour l'analyse. L'intégration du transgène dans les plantes analysées a été vérifiée par ACP et transfert de Southern.

La détection de l'activité β -glucuronidase a été effectuée par test histochimique, en détectant la coloration bleue résultant de l'hydrolyse de l'acide 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-glucuronique (X-GLU), et sa quantification a été effectuée par test fluorométrique, en mesurant la 4-méthylumbelliférone (MU) formée à partir d'acide 4-méthylumbelliréfyl β -glucuronique, selon les protocoles décrits par JEFFERSON et al. (Plant Mol. Biol. Report 5, 387-405, 1987).

1. Expression du gène *gus* dans les organes végétatifs

L'analyse a été effectuée sur les racines, les chaumes, et les feuilles.

Dans le cas des plants de riz non-transformés, ou de ceux transformés avec le vecteur pSPORT1-GUS, l'analyse histochimique ne révèle pas d'activité GUS, et les mesures fluorimétriques ne font apparaître qu'une activité très faible voire nulle.

Dans le cas des plants de riz transformés avec le vecteur pUGCI, on observe une activité GUS élevée (supérieure à 500 pmol MU/min/mg de protéine) dans tous les organes végétatifs testés.

5 Dans le cas des plants de riz transformés avec les constructions P1, P2, P3, P4 ou P5, on n'observe aucune coloration dans les organes végétatifs incubés en présence de X-GLU, et l'activité GUS mesurée par fluorométrie n'est pas significativement différente de
10 celles mesurée pour les plantes transformées avec le vecteur pSPORT1-GUS ou les plantes non transformées. Ces résultats montrent que le promoteur du gène *TaTrxh2* ne permet pas l'expression du gène *gus* dans les organes végétatifs.

15 2. Expression du gène *gus* dans les grains

Analyse histochimique

Au niveau des grains entiers

Les grains de riz, prélevés à 35 JAF (jours après fécondation) ont été coupés dans le sens
20 longitudinal puis incubés en présence de X-GLU.

Aucune coloration n'est détectée dans les grains de riz transformés avec le vecteur pSPORT1-GUS.

On détecte au contraire une coloration intense de la totalité du grain pour les grains de riz
25 transformés avec le vecteur pUGCI.

Dans le cas des grains de riz transformés avec les constructions P1, P2, P3 ou P4, une coloration bleue est détectée dans l'albumen des grains, mais pas dans l'embryon (axe cotylédonnaire et scutellum), les
30 enveloppes ou les épillets. Au niveau de l'albumen, cette coloration apparaît notamment à la périphérie de l'embryon, au dessus de l'épithélium du scutellum, et dans une zone médiane de l'albumen sur toute la longueur du grain.

Cette coloration est moins intense, et apparaît moins rapidement que celle observée dans les grains de riz transformés avec pUGCl. L'intensité de la coloration semble varier selon la construction (P1, P2, P3 ou P4) concernée. L'intensité la plus élevée est observée dans les grains de riz transformés avec la construction P2, et la plus faible dans ceux transformés avec la construction P4. Ces résultats sont confirmés par l'analyse des grains T1, où la coloration apparaît plus rapidement que dans les grains T0 et est plus intense.

Dans le cas des grains de riz transformés avec la construction P5, aucune coloration n'est détectée, ni dans l'embryon, ni dans l'albumen, ni dans les enveloppes.

15 *Au niveau des différents tissus du grain*

Pour déterminer précisément la localisation de l'expression du gène *gus* sous le contrôle du promoteur du gène *TaTrxh2*, des coupes histologiques ont été réalisées et observées au microscope photonique.

Ces observations montrent que, pour les constructions P1, P2, P3 ou P4, le marquage est localisé dans un petit nombre de cellules de l'albumen amylopectinisé situées à la périphérie de l'embryon et dans la zone centrale de l'albumen amylopectinisé. Les cellules de l'embryon, de la couche à aleurone et des enveloppes, ne sont pas marquées. Pour la construction P5, aucun marquage n'est visible.

Analyse fluorimétrique

L'activité GUS a été mesurée d'une part sur les embryons et d'autre part sur l'albumen des grains de riz.

L'activité GUS est nulle ou très faible dans les grains de riz transformés avec le vecteur pSPORT1-GUS, comme dans les grains de riz non-transformés. En revanche, elle est très forte (>500 pmol/MU/min/mg de

protéine) dans l'embryon et l'albumen des grains de riz transformés avec le vecteur pUGC1.

L'activité GUS mesurée dans les embryons des grains de riz transformés avec les constructions P1, P2
5 P3, P4 ou P5 n'est pas significativement différente de celle mesurée dans les grains de riz non-transformés ou de riz transformés avec le vecteur pSPORT1-GUS.

En revanche, l'activité mesurée dans l'albumen des grains de riz transformés avec les constructions P1,
10 P2, P3 ou P4, est 25 à 40 fois plus élevée que celle mesurée dans l'albumen des grains de riz non-transformés ou transformés avec le vecteur pSPORT1-GUS. Elle varie de 40 pmol/MU/min/mg de protéine pour les grains de riz transformés avec la construction P2, à 25 pmol/MU/min/mg
15 de protéine pour ceux transformés avec la construction P4. Pour la construction P5, aucune activité GUS n'est détectée dans les grains.

Ces résultats montrent que la région (-1111 pb à -83 pb) du promoteur du gène *TaTrxh2* permet
20 l'expression du gène *gus* uniquement dans les cellules de l'albumen amylicé, et que seule la délétion ne laissant subsister que 83 pb en amont de l'ATG a supprimé les séquences responsables de l'expression spatiale, dont certaines sont probablement localisées dans la région du
25 promoteur comprise entre -228 pb et -83 pb.

Le motif GCN4-like identifié lors de l'analyse de la structure du promoteur du gène *TaTrxh2* n'est donc
apparemment pas le seul responsable de la spécificité tissulaire de l'expression ; en effet, malgré sa délétion
30 dans les constructions P3 et P4, l'expression du gène *gus* demeure spécifique de l'albumen du grain.

Deux séquences : AACAAATCC, et AACAAAGTG (représentées en caractères gras sur la figure 1), sont
respectivement présentes à -51 pb et -381 pb par rapport
35 à l'ATG du gène *TaTrxh2*. Ces séquences présentent une similitude avec des motifs AACAA (AACAAACTCTATC) récemment

mis en évidence dans les promoteurs de 6 gènes codant des glutélines de riz, et intervenant dans l'expression albumen-spécifique de ces gènes.

5 **EXEMPLE 4 : EVOLUTION DE L'EXPRESSION DU GENE GUS AU COURS DU DEVELOPPEMENT DES GRAINS DES RIZ TRANSGENIQUES**

L'expression du gène *gus* a été suivie au cours de la maturation et de la germination de grains de riz transformés avec les constructions P1, P2, P3, P4 ou P5.

1. Au cours de la maturation

10 Trois stades ont été analysés : 10 JAF, 25 JAF et 35 JAF. L'expression du gène *gus* a été évaluée, soit par localisation histochimique de l'activité GUS, soit par détection des transcrits par transfert de Northern.

Activité GUS

15 L'analyse histochimique montre que pour les trois stades de maturation étudiés, 10, 25, et 35 JAF, une activité GUS est toujours détectée dans l'albumen amylicé des grains de riz transformés avec les constructions P1, P2, P3 ou P4. Par contre pour la
20 construction P5, aucune activité GUS n'est détectée.

A 10 JAF, l'activité GUS est détectée dans l'albumen amylicé, à la périphérie de l'embryon. A 25 JAF, l'activité GUS progresse vers la zone médiane de l'albumen amylicé. A 35 JAF, l'activité GUS est détectée
25 sur toute la surface de l'albumen amylicé.

L'intensité de la coloration varie avec la nature de la construction et le stade de maturation, en particulier dans le cas de la construction P4, pour laquelle la coloration est très difficile à détecter en
30 début de maturation.

Ces résultats sont confirmés par les observations plus détaillées au niveau de chaque tissu du grain, qui montrent que :

- A 10 JAF : pour les constructions P1, P2 ou
35 P3, l'activité GUS est très forte dans les cellules de

l'albumen amylicé à la périphérie de l'embryon, et elle n'est pas détectée dans les cellules de la zone médiane de l'albumen amylicé. Pour la construction P4, l'activité GUS dans les cellules de l'albumen amylicé est très
5 faible, voire non détectable. En outre, dans les grains de riz transformés avec la construction P2, une activité GUS est également détectée dans les cellules de l'épithélium du scutellum.

- A 25 JAF : pour les constructions P1, P2 ou
10 P3, l'activité GUS a diminué dans les cellules de l'albumen amylicé à la périphérie de l'embryon et augmente dans celles de la zone centrale de l'albumen amylicé ; pour les grains de riz transformés avec la construction P2, on ne détecte plus d'activité GUS dans
15 les cellules de l'épithélium du scutellum. Dans les grains de riz transformés avec la construction P4, l'activité GUS a augmenté dans les cellules de l'albumen amylicé situées à la périphérie de l'embryon et dans la zone centrale.

20 - A 35 JAF : l'activité GUS est beaucoup plus faible qu'à 25 JAF dans toutes les cellules de l'albumen amylicé des grains de riz transformés avec P1, P2 ou P3 ; dans les grains de riz transformés avec la construction P4, l'activité GUS est détectée dans les cellules de la
25 zone médiane de l'albumen amylicé.

Pour la construction P5, aucune activité GUS n'est détectée quel que soit le stade de maturation ou le tissu du grain analysé.

30 Quelle que soit la construction utilisée, aucune activité GUS n'est détectée au cours de la maturation, dans les cellules de l'axe embryonnaire, de la couche à aleurone, ou des enveloppes des grains.

Détection des transcrits du gène gus

35 La présence des transcrits du gène gus a été recherchée dans les ARN totaux extraits, aux différents stades de maturation, des grains de riz transformés avec

les constructions P1, P2, P3, P4 ou P5. La détection a été réalisée par transfert de Northern, en utilisant la sonde P3+GUS. Cette sonde de 2,6 kb comprend la séquence de 481 pb en amont de l'ATG du gène *TaTrxh2*, la séquence
5 codante du gène *gus* et le terminateur du gène *nos*.

Pour chacune des constructions P1, P2, P3, P4 ou P5, cette sonde permet de détecter la présence de transcrits dont la taille attendue est comprise entre 1,9 et 2,4 kb, selon la construction.

10 La présence de ces transcrits varie en fonction de la construction utilisée pour la transformation, et du stade de maturation.

Pour les riz transformés avec la construction P1, les transcrits sont détectés aux 3 stades de la
15 maturation avec un maximum à mi-maturation.

Pour les riz transformés avec la construction P2, les transcrits sont détectés au début de la maturation.

Pour les riz transformés avec la construction
20 P3, les transcrits sont détectés au début et à la fin de la maturation du grain.

Pour les riz transformés avec la construction P4, les transcrits sont détectés à mi-maturation et en fin de maturation du grain.

25 Pour les riz transformés avec la construction P5, aucun transcrit du gène *gus* n'est détecté quel que soit le stade de maturation analysé.

2. Au cours de la germination

30 Pour l'étude de l'expression du gène *gus* au cours de la germination, l'activité GUS a été analysée par histochimie dans des grains de riz transformés avec les constructions P1, P2, P3, P4 ou P5.

Pour chaque construction, 10 grains ont été mis à germer à l'obscurité et prélevés à différents temps
35 après imbibition : 0, 12, 24, 48 et 72 heures.

L'activité GUS est détectée dans l'albumen amylacé des grains de riz transformés avec les constructions P1, P2, P3 ou P4 quel que soit le stade de germination. Par contre pour les grains de riz transformés avec la construction P5 aucune activité GUS n'est détectée.

L'étude de l'accumulation des transcrits du gène *gus* dans les grains transformés avec les constructions P1, P2, P3 ou P4 montre que ceux-ci ne sont pas accumulés au cours de la germination quelle que soit la construction.

Ces résultats indiquent que le promoteur (1111 pb en amont de l'ATG) du gène *TaTrxh2* ne permet pas l'expression du gène *gus* au cours de la germination. L'activité GUS détectée dans les grains germés est certainement une activité résiduelle due à la très grande stabilité de la β -glucoronidase dans le grain.

Conclusion

L'analyse de l'expression du gène *gus* sous le contrôle du promoteur du gène *TaTrxh2* au cours du développement des grains de riz transformés avec les constructions P1, P2, P3, P4 ou P5 met en évidence un effet des délétions du promoteur du gène *TaTrxh2* sur l'expression temporelle et spatiale du gène *gus* dans les grains des riz transformés.

Les constructions P1, P2, P3 permettent une expression du gène *gus* plus précoce que la construction P4 au cours de la maturation. La construction P5 ne permet pas l'expression du gène *gus* puisqu'aucun transcrit n'est détecté. En effet, des transcrits du gène *gus* sont détectés à 10 JAF pour les 3 constructions P1, P2, P3, et seulement 25 JAF pour la construction P4. Ceci suggère que les différences de niveau d'expression précédemment signalées entre les constructions P2 et P4, résultent probablement d'un retard dans l'expression du gène *gus* sous le contrôle du promoteur P4, plutôt que

d'un niveau d'expression plus faible. La région du promoteur du gène *TaTrxh2* comprise entre -1111 pb et -228 pb contient certainement des séquences de régulation qui permettent une expression du gène *gus* dans les premiers stades de la maturation.

Concernant l'expression spatiale, la région du promoteur du gène *TaTrxh2* comprise entre -1111 pb et -591 pb contient probablement une séquence inhibant l'expression du gène dans l'épithélium du scutellum. En effet, lorsqu'elle est délétée (construction P2) l'expression du gène *gus* est observée dans ce tissu. A l'inverse, la région comprise entre -591 pb et -451 pb contiendrait une séquence activant l'expression dans l'épithélium du scutellum, car lorsqu'elle est délétée (construction P3) il n'y a plus d'expression du gène *gus* dans ce tissu.

Les résultats montrent qu'au cours de la maturation des grains de riz, le promoteur du gène *TaTrxh2* permet une expression du gène *gus* spécifique de l'albumen amylicé. Cette expression est détectée dans un nombre restreint de cellules réparties dans une zone centrale de l'albumen et à la périphérie de l'embryon.

On a observé que les grains de riz
qui ont été traités avec le gène *gus*

REVENDICATIONS

1) Promoteur caractérisé en ce qu'il est constitué par un fragment d'acide nucléique comprenant au moins un domaine fonctionnel spécifique du promoteur du gène *TaTrxh2*.

2) Promoteur selon la revendication 1, caractérisé en ce que ledit fragment d'acide nucléique est choisi dans le groupe constitué par :

- le fragment d'acide nucléique dont la séquence s'étend de la position -1 à la position -1111 par rapport au codon ATG du gène *TaTrxh2* ;
- le fragment d'acide nucléique dont la séquence s'étend de la position -1 à la position -83 par rapport au codon ATG du gène *TaTrxh2* ;
- le fragment d'acide nucléique dont la séquence s'étend de la position -451 à la position -591 par rapport au codon ATG du gène *TaTrxh2* ;
- le fragment d'acide nucléique dont la séquence s'étend de la position -591 à la position -1111 par rapport au codon ATG du gène *TaTrxh2* ;
- le fragment d'acide nucléique dont la séquence s'étend de la position -228 à la position -451 par rapport au codon ATG du gène *TaTrxh2* ;
- le fragment d'acide nucléique dont la séquence s'étend de la position -451 à -591 par rapport au codon ATG du gène *TaTrxh2* ;
- le fragment d'acide nucléique dont la séquence s'étend de la position -83 à la position -228 par rapport au codon ATG du gène *TaTrxh2* ;
- le fragment d'acide nucléique dont la séquence est celle du premier intron du gène *TaTrxh2*.

3) Cassette d'expression caractérisée en ce qu'elle comprend un promoteur selon une quelconque des revendications 1 ou 2.

4) Vecteur recombinant caractérisé en ce qu'il comprend au moins un promoteur selon une quelconque des revendications 1 ou 2.

5) Cellule végétale transformée par au moins un promoteur selon une quelconque des revendications 1 ou 2.

6) Plante transgénique transformée par au moins un promoteur selon une quelconque des revendications 1 ou 2.

7) Plante transgénique selon la revendication 6, caractérisée en ce qu'il s'agit d'une monocotylédone.

8) Utilisation d'un promoteur selon une quelconque des revendications 1 ou 2 pour contrôler l'expression d'un gène d'intérêt dans une cellule végétale.

09/979549

P1
↑GAAGTCAGAAGGCCGTTTCAGAATTGTTGGAGGACTCGAAAAAAGAAGGGGAGCCCAGGC 60
AGACGACGGGGCGGCATGTGCCTGTTCTTGGCGAGGCGTCTAGCTTTGGCAGCCGCCGC 120
CGCTTTTCTCCTTGGGTGGGCGCGGAGCTCCCCGAGTTTGAGCCGCAATTTTTTTTACAT 180
TTTATGGCGATGGCGTCAGGCGTTTATCTAGGCGTCTGGGAGGGTACATTTGAAGATGTG 240
CCACCAACTCCAAACCGACAACCCTGTATCTGAGCATGCCTCATGCCTCTCCTTCATGCC 300
TCCCTTTGGGTGAGGTCATGTGCCCTTGGCGGCGAGTGGCTTCCCGTTTAGAGCAAGTAT 360
AATAAGTCCTAGTCAGCTGGCTATAAGATGTTCCACATCAGCAAATCCTTAACTGGAGG 420
P2
↑AGAAAGAAAGTAGGAGTGAGAAGGGCGTCGGCGCTTCGTCAATCGCTAGCGATAGCACAA 480
GCTCCCATGGAATCGAGCCAACATGCAACCCGCGACAATGACTAAAGGCAAACGCCAGCCA 540
P3
ATCAGTATGCTTTCTCTGCACTCTTTCTTCATGCAAGCATTAAATACTATAGCTAATCTA 600
CAGCCAGTTTATTATATAAACAGGCTATATAGCTGACCTGGCAGTGCTATAGAGCCGGCA 660
GCCGGCTCTTCTATTAGCTTTGCTCTTATGGCTACATCTGTGTGAGCAGTCGATTGATTCT 720
AAACAACAAATCCGGGCGTTTCAGCAAGTCGGAATGAATTTCCGGCTCATCACTCATTGTCTG 780
TGGGCCTCACGCGTATTCGCCTAACCGTGTTTGAATCAGACCCCTCACGAAGCCACGGCTC 840
P4
CAGCGACCCGTTTACCACGTCAGCCTAAAAAAGAAAAAAACTGTTCATCACACGCC 900
catctgAACCGTTCAACAGCCCCACGTAATTTGCGGCACCAGCAAAGGGCATATCCGTCA 960
TAGCGAGCGCATAAATTCTGATTCTGCCTGCCTGCCGGACAATTTATCTTTGGGGAGGC 1020
P5
GGGCCGGGATTGGAGACAGAGCCCACAAGGCAACAACAAAGTGCGCGTGAGAAATCAACA 1080
AGCGGTGCTTGCCGAGAAGAGAGAGAGAGAG 1111

FIG. 1

10-10-00

Rec'd PCT/PTO 30 MAY 2002

SEE ATTACHED

LISTAGE DE SEQUENCES

<110> INRA

<120> Promoteur du gène TaTrxh2

<130> MJPCb539/87

<140>

<141>

<160> 2

<170> PatentIn Vers. 2.0

<210> 1

<211> 2687

<212> ADN

<213> Triticum aestivum

<220>

<221> exon

<222> (1112)..(1231)

<220>

<221> intron

<222> (1232)..(2203)

<220>

<221> exon

<222> (2204)..(2326)

<220>

<221> intron

<222> (2327)..(2420)

<220>

<221> exon

<222> (2421)..(2558)

<220>

<221> CDS

<222> (1112)..(1231)

<220>

<221> CDS

<222> (2204)..(2326)

<220>

<221> CDS

<222> (2421)..(2558)

<400> 1

gaagtcagaa ggccggttcag aattgttgga ggactcgaaa aaaagaagg gagcccaggc 60
agacgacggg gcggcatgtg cctgttcctt ggcgaggcgt ctagctttgg cagccgccgc 120
cgcttttctc cttgggtggg cgcgcgagct ccccgagttt gagccgcaat tttttacat 180
tttatggcga tggcgtcagg cgtttatcta ggcgtctggg aggttacatt tgaagatgtg 240
ccaccaactc caaaccgaca accctgtatc tgagcatgcc tcatgcctct cttcatgcc 300

tccctttggg tgaggtcatg tgccttggc ggcgagtggc ttcccgttta gagcaagtat 360
aataagtcct agtcagctgg ctataagatg ttccacatca gcaaactcct aaactggagg 420
agaaagaaa taggagtgag aagggcgctg gcgcttcgta aatcgctagc gatagcacaa 480
gctcccatgg aatcgagcca acatgcaacc cgcacaatga ctaaaggcaa acgccagcca 540
atcagtatgc ctttctctgc atctttcttc atgcaagcat taaatactat agctaattcta 600
cagccagttt attatataaa caggtatat agctgacctg gcagtgctat agagccggca 660
gccggtctt ctattagctt tgctcttatg gctacatctg tgtgagcagt cgattgatct 720
aaacaacaaa tccgggcgtt cagcaagtcg gaatgaattt cggctcatca ctcatgtcg 780
tgggcctcac gcgtattcgc ctaaccgtgt ttgaatcaga ccctcacgaa gccacggctc 840
cagcgacccg ttcaccacgt cagcctaaaa aaagaaaaaa aaactgttca atcacacgcc 900
catctgaacc gttcaacagc cccacgtaat ttccgcacc agcaaagggc atatccgtca 960
tagcgagcgc ataaattctg attcctgcct gcccgccgga caatttatct ttggggaggc 1020
gggccgggat tggagacaga gccacaagg caacaacaaa gtgcgcgtga gaaatcaaca 1080
agcgggtgctt gccgagaaga gagagagaga g atg gcg gcg tcg gcg gcg acg 1132
Met Ala Ala Ser Ala Ala Thr
1 5

gca acg gcg gcg gcg gtg ggg gcg ggg gag gtg atc tcc gtc cac acc 1180
Ala Thr Ala Ala Val Gly Ala Gly Glu Val Ile Ser Val His Thr
10 15 20

ctg gag cag tgg acc atg cag atc gag gag gcc aac gcc gcc aag aag 1228
Leu Glu Gln Trp Thr Met Gln Ile Glu Ala Asn Ala Ala Lys Lys
25 30 35

ctg gtacgcatct ttccggatcg atctctccct cccccctcgt cttctccgc 1281
Leu
40

aaggcggcac gggccgggag aggatgctct tgtttcagat tggttggtga agttaagacc 1341
tggctcgtgc atgcggtggc cgcccgagga cgaatctgcg gttggtctgg ttgaattttg 1401
atggcttgga gagcatgta cggtcggtt ctttcccccg tcttattagg gctgccgtgg 1461
atatcatctt ctcatgttaa aaaggagaca gtttcagaac cgcgtgtacc gctacttct 1521
cggtttctaa atatagatct tctaagattg caccacggac tatgtactga tgtatgtata 1581
tatatacata cttcagagta tagatcactc gttttgctcc gtatgtagta tgcagttcac 1641
ggggggcaca tctgtttgta tgggtctttt gtctgaaaac agtgttggtt atgctgtaat 1701
gtcatggcat ctttctgcga tgcagggggc atggctcttt acattaccct tgcagcattt 1761
tattgtttcc gcatcgtgct gcctcacatg cttttttaga ttgtatagga attgctattg 1821
cacgcaatta tccccttate cgtggctgct gcagatttgc accaatattc cgtatgtaga 1881

tcccaaacgt ctccctcaagt ttggcatagt aagatcgatt gtgctaactc cactaaaaaac 1941
 actgtaccag gaatttatat gatgatcatc ttgtgtttg tatatatattt ttgcggggg 2001
 agtttataac tttcogtgga ttttcatctc tgaaattgtg gaacatcata aaattccagt 2061
 gctattctct tcacgtgaat tataacctgg attgattgta agctctggta ggtgtttatg 2121
 gtgttgaact agcagtagca ttattgaccc atgctttgca catttggtgc aaggtcctgt 2181

taaccttgtc gtttgtaaca g gtg gtg gtt gac ttc act gca tca tgg tgt 2232
 Val Val Val Asp Phe Thr Ala Ser Trp Cys
 45 50

gga cca tgc cgc atc atg gct cca gtt ttc gct gat ctc gcc aag aag 2280
 Gly Pro Cys Arg Ile Met Ala Pro Val Phe Ala Asp Leu Ala Lys Lys
 55 60 65

ttc cca aat gct gtt ttc ctc aag gtc gat gtc gat gaa ctg aag 2325
 Phe Pro Asn Ala Val Phe Leu Lys Val Asp Val Asp Glu Leu Lys
 70 75 80

gtaatggaac cgatggcgct gtttacagag cacagagtat catcgtgcga tttcagagct 2385

gtgttactaa caaggtttta tggtgtatga acagcccatt gcg gag caa ttc agc 2440
 Glu Gln Phe Ser
 85

gtt gag gcc atg cca acc ttc ctg ttc att aag gaa gga gat gtc aag 2488
 Val Glu Ala Met Pro Thr Phe Leu Phe Ile Lys Glu Gly Asp Val Lys
 90 95 100

gac agg gtt gtg gga gct atc aag gag gaa ctg acg aac aag gtt ggg 2536
 Asp Arg Val Val Gly Ala Ile Lys Glu Leu Thr Asn Lys Val Gly
 105 110 115

cta cac gcg gcg gcc cag taatcaccta gcggagtagt attcgccata 2584
 Leu His Ala Ala Ala Gln
 120

ataaaattgt ggctcaagaa gcggtgcctc taatggcacc ttatatcctg tgtactgctt 2644

gttacttggt ggttgatga tggatgaatca agtgtgactt tat 2687

<210> 2

<211> 1111

<212> ADN

<213> Triticum aestivum

<400> 2

gaagtcagaa ggccgttcag aattgttgga ggactcgaaa aaaagaaggg gagcccaggc 60

agacgacggg gcggcatgtg cctgttcctt ggcgaggcgt ctacttttg cagccgccgc 120

cgcttttctc cttgggtggg cgcgcgagct ccccgagttt gagccgcaat tttttacat 180

tttatggcga tggcgtcagg cgtttatcta ggcgtctggg agggtagatt tgaagatgtg 240

ccaccaactc caaaccgaca accctgtatc tgagcatgcc tcatgcctct ccttcatgcc 300

tccctttggg tgaggtcatg tgcccttggc ggcgagtggc ttcccgttta gagcaagtat 360
aataagtcct agtcagctgg ctataagatg ttccacatca gcaaatcctt aaactggagg 420
agaaagaaag taggagtgag aagggcgctg ggcgttcgtc aatcgctagc gatagcacia 480
gtcccatgg aatcgagcca acatgcaacc cgcacaatga ctaaaggcaa acgctagcca 540
atcagtatgc ctttctctgc atctttcttc atgcaagcat taaatactat agctaatacta 600
cagccagttt attatataaa caggctatat agctgacctg gcagtgttat agagccggca 660
gccggctctt ctattagctt tgctcttatg gctacatctg tgtgagcagt cgattgattc 720
aaacaacaaa tccgggcgtt cagcaagtcg gaatgaattt cggctcatca ctcattgtcg 780
tgggcctcac gcgtattcgc ctaaccgtgt ttgaatcaga ccctcacgaa gccacggctc 840
cagcgacctg ttcaccacgt cagcctaaaa aaagaaaaaa aaactgttca atcacacgcc 900
catctgaacc gttcaacagc cccacgtaat ttcgcgcacc agcaaagggc atatccgtca 960
tagcgagcgc ataaattctg attcctgcct gcctgccgga caatttatct ttggggaggc 1020
gggccgggat tggagacaga gccacaagg caacaacaaa gtgcgcgtga gaaatcaaca 1080
agcggtgctt gccgagaaga gagagagaga g 1111

7/23



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 00/01318

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12N15/82 A01H5/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N A01H

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, STRAND, BIOSIS, MEDLINE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BRUGIDOU C ET AL.: "The Nicotiana tabacum genome encodes two cytoplasmic thioredoxin genes which are differentially expressed" MOLECULAR AND GENERAL GENETICS, vol. 238, 1993, pages 285-293, XP002129274 cited in the application the whole document	1,3,4
A	WO 96 03505 A (AGRONOMIQUE INST NAT RECH ;GAUTHIER MARIE FRANCOISE (FR); LULLIEN) 8 February 1996 (1996-02-08) the whole document	1-8

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

*** Special categories of cited documents :**

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

28 August 2000

Date of mailing of the international search report

04/09/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Oderwald, H

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 00/01318

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9603505 A	08-02-1996	FR 2723097 A	02-02-1996
		AU 3082795 A	22-02-1996
		EP 0802977 A	29-10-1997

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Des le internationale No

PCT/FR 00/01318

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 7 C12N15/82 A01H5/00

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 C12N A01H

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, STRAND, BIOSIS, MEDLINE

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	BRUGIDOU C ET AL.: "The Nicotiana tabacum genome encodes two cytoplasmic thioredoxin genes which are differentially expressed" MOLECULAR AND GENERAL GENETICS, vol. 238, 1993, pages 285-293, XP002129274 cité dans la demande le document en entier	1,3,4
A	WO 96 03505 A (AGRONOMIQUE INST NAT RECH ;GAUTHIER MARIE FRANCOISE (FR); LULLIEN) 8 février 1996 (1996-02-08) le document en entier	1-8

☐ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"Z" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

28 août 2000

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

04/09/2000

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Oderwald, H

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Des le internationale No

PCT/FR 00/01318

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9603505 A	08-02-1996	FR 2723097 A	02-02-1996
		AU 3082795 A	22-02-1996
		EP 0802977 A	29-10-1997